

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12N 15/11, 15/63, 15/82, 9/16		A1	(11) 国際公開番号 WO96/30510
			(43) 国際公開日 1996年10月3日(03.10.96)
(21) 国際出願番号 PCT/JP96/00812 (22) 国際出願日 1996年3月28日(28.03.96)		(81) 指定国 AU, CA, CN, JP, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書	
(30) 優先権データ 特願平7/96126 1995年3月29日(29.03.95) JP (71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 日本たばこ産業株式会社(JAPAN TOBACCO INC.)[JP/JP] 〒105 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 森岡真二(MORIOKA, Shinji)[JP/JP] 植木潤(UEKI, Jun)[JP/JP] 〒438 静岡県磐田郡豊田町東原700 日本たばこ産業株式会社 遺伝育種研究所内 Shizuoka, (JP) (74) 代理人 弁理士 谷川英次郎(TANIGAWA, Hidejiro) 〒102 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 岩田ビル6階 谷川国際特許事務所 Tokyo, (JP)			
(54) Title : DNA FRAGMENT, RECOMBINATION VECTOR CONTAINING THE SAME, AND METHOD OF THE EXPRESSION OF ALIEN GENE WITH THE USE OF THE SAME			
(54) 発明の名称 DNA断片、それを含む組換えベクター及びそれを用いた外来遺伝子の発現方法			
<p>a ... DNA insert</p>			
(57) Abstract			
<p>A novel DNA which has a sequence different from those of publicly known DNAs capable of promoting the expression of an alien gene and can remarkably promote the expression of an alien gene. An isolated DNA fragment having a base sequence represented by SEQ ID NO:1 in the Sequence Listing; and an isolated DNA fragment represented by this base sequence wherein one or more nucleotides have been added, inserted, deleted or replaced and having the effect of promoting the expression of a gene located in the downstream thereof.</p>			

(57) 要約

外来遺伝子の発現を促進することができる公知のDNAとは異なる配列を有する、新規なDNAであって、外来遺伝子の発現を大いに促進することができるDNAが開示されている。本発明は、配列表の配列番号1で示される塩基配列を有する単離されたDNA断片及び該塩基配列において1又は複数のヌクレオチドが付加、挿入、欠失若しくは置換されておりかつその下流に存在する遺伝子の発現を促進する作用を有する単離されたDNA断片を提供する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

明細書

DNA断片、それを含む組換えベクター及びそれを用いた外来遺伝子の発現方法

技術分野

本発明は、遺伝子の発現を促進する作用を有する新規なDNA断片、それを含む組換えベクター及びそれを用いた外来遺伝子の発現方法に関する。

背景技術

外来遺伝子の発現を促進することは、遺伝子工学の手法を植物に応用する際に最も必要とされる技術のひとつである。その方法のひとつとして遺伝子の発現を促進する塩基配列を持つDNAの利用が挙げられる。

10 外来遺伝子の発現を促進する塩基配列としては、ヒマのカタラーゼのイントロン（特開平03-103182; Tanaka et al. Nucleic Acids Res. 18, 6767-6770 (1990)）等が知られている。しかしながら、対象とする植物が多岐にわたること、また目的とする生育段階あるいは組織器官での発現促進が必要になることから、多くの種類の遺伝子発現を促進するDNAが利用できることが望まれる。

発明の開示

従って、本発明の目的は、外来遺伝子の発現を促進することができる公知のDNAとは異なる配列を有する、新規なDNAであって、外来遺伝子の発現を促進することができるDNAを提供することである。

20 本願発明者らは、銳意研究の結果、イネのホスホリハーゼD（以下、「PLD」ということがある）のcDNAとイネのゲノムDNAとの塩基配列を比較することによりイネPLD遺伝子のイントロンを見出し、かつ、これらのイントロンのうちの1つがその下流の遺伝子の発現を顕著に促進する効果を有することを見出し本発明を完成した。

すなわち、本発明は、配列表の配列番号1で示される塩基配列を有する単離されたDNA断片及び該塩基配列において1又は複数のヌクレオチドが付加、挿入、欠失若しくは置換されておりかつその下流に存在する遺伝子の発現を促進する作用を有する単離されたDNA断片を提供する。また、本発明は、前記本発明のDNA断片と、その下流に機能的に連結された発現すべき外来遺伝子とを含む組換えベクターを提供する。さらに、本発明は、前記本発明の組換えベクターを宿主

細胞に導入し、前記外来遺伝子を発現させることから成る、外来遺伝子の発現方法を提供する。

下記実施例において実験的に確認されたように、本発明のDNA断片は、その下流に位置する遺伝子の発現を大幅に促進する。従って、本発明は、遺伝子工学的手法により外来遺伝子を発現させることに大いに貢献するものと考えられる。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の実施例において本発明のDNA断片を挿入したpB1221の遺伝子地図の要部である。

発明を実施するための最良の形態

上述のように、本発明のDNA断片は配列表の配列番号1に示す塩基配列を有する。本発明のDNA断片は、下記実施例において詳述するように、イネPLD遺伝子のcDNAと、対応するイネゲノムDNAとの塩基配列を比較することによりイネPLD遺伝子上流のイントロンを同定し、これらのイントロンのうち5'非翻訳領域に対応する位置に存在する173bpのイントロン配列を含む断片をPCRにより調製してレポーター遺伝子を有する発現ベクターの該レポーター遺伝子の上流に組み込み、該レポーター遺伝子の発現活性を比較することにより、下流の遺伝子の発現を促進する作用を確認したものである。本発明のDNA断片の塩基配列は、イネゲノム中のPLD遺伝子の塩基配列を示す配列表の配列番号3に示されるイネゲノミックPLD遺伝子の塩基配列の第1661塩基から第1843塩基に相当する。

なお、イネPLD遺伝子上流に存在する上記173bpのイントロン配列の塩基配列を配列表の配列番号4に示す。配列番号4に示される配列も、当然、下流の遺伝子の発現を促進する作用を有する。配列番号4に示す塩基配列は、イネゲノム中のPLD遺伝子の塩基配列を示す配列表の配列番号3に示されるイネゲノミックPLD遺伝子の塩基配列の第1666塩基から第1838塩基に相当する。

本発明のDNA断片は、イネPLD遺伝子の上流に存在するイントロンであり、本発明によりその塩基配列が明確になっているので、イネのゲノムDNAを鑄型とするPCRにより容易に調製することができる。PCRは遺伝子工学の分野において多用される常法であり、そのためのキットも市販されているので当業者

ならば容易に実施可能である。また、その具体的な一例が下記実施例に詳述されている。

なお、一般に、生理作用を有するDNA配列において、1又は複数のヌクレオチドが付加、挿入、欠失若しくは置換された場合であっても、その生理活性を維持する場合があることは当業者において広く認められているところである。本発明には、このような修飾が加えられ、かつ下流の遺伝子の発現を促進する作用を有するDNA断片も含まれる。すなわち、配列表の配列番号1で示される塩基配列において1又は複数のヌクレオチドが付加、欠失若しくは置換されておりかつその下流に存在する遺伝子の発現を促進する作用を有するDNA断片も本発明の範囲内に含まれる。特に、配列番号1で示される塩基配列のうち5'末端側の5塩基及び3'末端側の6塩基はエキソン部分であるので、これらの配列が欠失しているものも遺伝子発現促進作用を有するものと考えられ、これらも本発明の範囲に含まれる。

ヌクレオチドの付加、挿入、欠失又は置換は、例えば周知技術である部位特異的変異誘発（例えばNucleic Acid Research, Vol. 10, No. 20, p6487-6500, 1982）により実施することができ、本明細書において「1又は複数のヌクレオチド」とは、部位特異的変異誘発法により付加、挿入、欠失又は置換できる程度の数のヌクレオチドを意味する。

部位特異的変異誘発は、例えば、所望の変異である特定の不一致の他は変異を受けるべき一本鎖ファージDNAに相補的な合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いて次のように行うことができる。すなわち、プライマーとして上記合成オリゴヌクレオチドを用いてファージに相補的な鎖を合成させ、得られた二重鎖DNAでファージ担持性宿主細菌を形質転換する。形質転換された細菌の培養物を寒天にプレートし、ファージを含有する単一細胞からプラークを形成せしめる。そうすると、理論的には、50%の新コロニーが単鎖として変異を有するファージを含有し、残りの50%が元の配列を有する。得られたプラークを、上記所望の変異を有するDNAと完全に一致するものとはハイブリッド形成するが、もとの鎖を有する不一致のものとはハイブリッド形成しない温度において、キナーゼ処理された合成プローブとハイブリッド形成せしめる。次に該プローブとハイブ

リド形成するブラークを拾い、培養し、DNAを回収する。

なお、塩基配列に、下流の遺伝子の発現を促進する作用を喪失せしめない1又は複数のヌクレオチドの置換、欠失、付加又は挿入の方法としては、上記の部位特異的変異誘発の他にも、遺伝子を変異原で処理する方法及び遺伝子を選択的に
5 開裂し、次に選択されたヌクレオチドを除去、付加、挿入又は置換し、次いで連結する方法もある。

本発明のDNA断片は、その下流の遺伝子の発現を促進する作用を有する。従って、発現させるべき所望の外来遺伝子の転写領域、好ましくは転写領域の5'末端側の領域に本発明のDNA断片を挿入することにより、該外来遺伝子の発現
10 を促進することができる。外来遺伝子の発現方法は遺伝子工学の分野において既に確立されている。すなわち、発現ベクターのクローニング部位に所望の外来遺伝子を挿入し、これを宿主細胞に導入して発現させることにより外来遺伝子を発現させることができる。そして、本発明の方法では、このような常法による外来遺伝子の発現方法において、該外来遺伝子の上流に上記本発明のDNA断片を、
15 該外来遺伝子と機能的に連結された態様で挿入して、該外来遺伝子の発現を行う。ここで、本発明のDNA断片がその下流の発現すべき遺伝子と「機能的に連結された」とは、本発明のDNA断片を挿入することにより、これを挿入しない場合に比べて前記外来遺伝子の発現が検出可能な程度に増加することを意味する。本発明のDNAは発現を促進すべき外来遺伝子の直上流に挿入されていてもよいが、
20 本発明のDNAと該外来遺伝子の間に他の配列が介在していてもよい。この介在する配列の長さは特に限定されないが、通常0~1000bp程度である。また、本発明のDNA断片の上流には、プロモーター配列が存在するが、本発明のDNA断片はプロモーターの直下流に挿入されていてもよいし、プロモーターと本発明のDNAの間に他の配列が介在していてもよい。この介在する配列の長さは特に限定されないが、通常0~1000bp程度である。要は、本発明のDNA断片を挿入することにより、これを挿入しない場合に比べて前記外来遺伝子の発現
25 が検出可能な程度に増加する組換えベクターは、全て本発明の範囲内に含まれる。

本発明のDNA断片のベクター中への挿入は、発現ベクターのクローニング部位の塩基配列がわかっているので、適当な制限酵素や必要によりリンカーを用い

ることにより容易に行うことができる。

なお、このような発現ベクターは、種々のものがこの分野において周知であり、かつ市販されている。これらの発現ベクターは、宿主細胞内で複製するための複製開始点、プロモーター、外来遺伝子を挿入するための制限酵素部位を与える
5 クローニング部位及び薬剤耐性遺伝子等の選択マーカーを少なくとも含み、通常、転写を安定に終了させるターミネーターや、宿主が細菌の場合にはSD配列を含む。本発明の方法においては、これらの公知の発現ベクターのいずれをも採用することができる。

実施例

10 以下、本発明を実施例に基づきさらに具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

1. 米ぬか PLD の精製

精製にあたり、米ぬか PLD の精製に関する文献（高野ら、日本食品工業学会誌 34, 8-13(1987)）を参考にした。酵素活性は、ホスファチジルコリンを基質とし、酵素反応によって生成したコリンをコリンオキシダーゼ法により定量して測定した（Imamura et al., J. Biochem. 83, 677-680(1978)）。ただし、PLD の酵素反応は、95°C、5 分の熱処理によって停止した。

すなわち、イネ(*Oryza sativa*) "コシヒカリ" の米ぬか 100 g に 1 リットルのヘキサンを加え一昼夜攪拌、脱脂した後、10 g のポリクラールAT（商品名：ポリビニルビロドン、GAF Chemical 社製）、500 ml の 1 mM CaCl₂、5 mM 2-メルカブトエタノールを含む 10 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7)を加え 1 時間攪拌し酵素を抽出した。抽出液を 8 層ガーゼで濾したのち 15,000 x g で 20 分遠心し、中間層を粗抽出液とした。粗抽出液を硫安で処理し (65%飽和)、生じた沈殿を遠心分離 (15,000 x g, 20 分) により集め、溶解後上記緩衝液に透析した。透析後、遠心して沈殿を取り除き硫安画分とした。

硫安画分を緩衝液A (10mM Tris-HCl pH 7, 1 mM CaCl₂, 1 mM 2-メルカブトエタノール) で平衡化した DEAE-Cellulose (ワットマン社製) のカラム (2.0 x 10 cm) に添加した。約 100 ml の 50 mM NaCl を含む緩衝液Aで洗浄した後、50 - 350 mM NaCl の直線的な濃度勾配を持つ緩衝液A 120 ml で溶離した。

PLD は NaCl 濃度 0.2 M 付近で溶離した。PLD 活性を示すフラクションを回収し、溶離液 (DEAE-Cellulose) とした。

溶離液 (DEAE-cellulose) に 3 M 硫安を加え 1 M 硫安溶液とし、1 M 硫安を含む緩衝液Aで平衡化した Phenyl sepharose カラム (ファルマシア社製、2.6 x 10 cm) に添加した。1.0 - 0 M 硫安の濃度勾配を持つ緩衝液A 240 ml で溶離した。PLD は、硫安濃度 0.1 M 付近で溶離した。活性を示すフラクションを回収し、緩衝液Aに対して透析し、溶離液 (Phenyl sepharose) とした。

溶離液 (Phenyl sepharose) を緩衝液Aで平衡化した Mono Q カラム (ファルマシア社製陰イオン交換カラム、16 x 10 cm) に添加し、50 - 350 mM NaCl の濃度勾配を持つ緩衝液A 150 ml で溶離した。PLD は、NaCl 濃度 210 mM から 235 mM にかけて溶離した。PLD 活性を示す分画を回収してこの溶液を緩衝液Aに対して透析し、溶離液 (Mono Q 1st) とした。

溶離液 (Mono Q 1st) を遠心限外濾過により 0.5 ml に濃縮し、0.1 M NaCl を含む緩衝液Aで平衡化した Superose 6 カラム (ファルマシア社製、1.0 x 30 cm) に添加し、同様の緩衝液で溶離した。PLD は、分子量 78 kDa と推定された。PLD 活性を示す分画を回収し溶離液 (Superose 6) とした。

溶離液 (Superose 6) に 2.5 ml の 40% キャリアアンフォライト (Pharmacia、pH 4.0-6.0) と蒸留水を加えて 50 ml とし、Rotofore (バイオラッド社製) を使用して、等電点電気泳動を行った。泳動は 2°Cにて 12 W 定電力で 4 時間行った。PLD 活性は、pH 4.9 付近に認められた。PLD 活性を示す分画を回収し、この溶液を緩衝液Aに対して透析し、等電点電気泳動画分とした。

等電点電気泳動画分を緩衝液Aで平衡化した Mono Q カラム (ファルマシア社製、0.5 x 5 cm) に添加し、50 - 350 mM NaCl の直線的な濃度勾配を持つ緩衝液Aで溶離した。PLD は、NaCl 濃度 210 mM 付近と 235 mM 付近で溶離した。PLD 活性を示す 2 つの分画を回収し、溶離液 (Mono Q 2nd-I、II) とした。

溶離液 (Mono Q 2nd-I、II) の純度検定を、7.5%のアクリルアミドを用いた SDS- ポリアクリルアミド電気泳動 [laemmli(1970)] で行った。泳動後、ゲルをクーマシー・ブリリアント・ブルー R250 で染色した。いずれの溶離液の場合も、分子量 82 kDa の位置に主たるバンドが認められ、溶離液 (Mono Q 2nd-II)

では、単一のバンドであった。

以上の精製により、溶離液 (Mono Q 2nd-I, II) の精製倍率は、粗抽出液に
対してそれぞれ 380 倍、760 倍となった。

2 画分について酵素の性状解析を行った。その結果を下記表 1 に示す。至適 pH
5 H 検定に用いた緩衝液は酢酸ナトリウム (pH 4-6), MES-NaOH (pH 5.5-7.0),
Tris-HCl (pH 7-9) でいずれも 100 mM とした。pH 安定性は、各 pH に 25 °C
で 30 分間置いた後、残存活性を測定し、活性の低下が認められない範囲を示した。
温度安定性は、4 °C, 25°C, 37°C および 50 °C の各温度に 30 分間置いた後、
残存活性を測定した。基質特異性は、基質濃度 5 mM で測定し、ホスファチジル
10 コリンに対する酵素作用を 100 とした相対活性で示した。

表 1

	Mono Q 2nd-I	Mono Q 2nd-II
Km 値	0.29 mM	0.29 mM
至適 pH	6	6
pH 安定性	7-8	7-8
温度安定性	4-37 °C	4-37 °C
Ca ²⁺ 依存性	20 mM 以上	20 mM 以上
基質特異性		
ホスファチジルコリン	100	100
リゾホスファチジルコリン	13	12
スフィンゴミエリン	6	4

2. 精製したタンパク質が PLD であることの証明

純度検定の場合と同様に、溶離液 (Mono Q 2nd-I, II) をそれぞれ SDS- ポ
リアクリルアミド電気泳動にて分離し、PVDF 膜 (ミリポア社製) に転写後、染
15 色した。82 kDa タンパク質のバンドを切り出し、プロテインシーケンサー (島
津製作所、PSQ-1) にて N 末端アミノ酸配列を決定した。いずれも 10 残基まで解

析可能で、同一の配列であった。その配列を以下に記す。

Val Gly Lys Gly Ala Thr Lys Val Tyr Ser

2つの活性画分に認められる 82 kDa タンパク質の関係は明らかでないが、少なくともアミノ酸配列のレベルで類似性は高いと考えられ、抗体作製のための抗 5 原調製において、両画分の混合液を用いて問題はないと判断した。

溶離液 (Mono Q 2nd-1, II) の混合液を、7.5%のアクリルアミドを用いた SDS- ポリアクリルアミド電気泳動で分離し、ゲルをクーマシー・ブリリアント・ブルーR250 で染色した。82 kDa タンパク質のバンドを切り出し、電気溶出(25 mM Tris, 192 mM グリシン、0.025% SDS, 100V, 10 時間) により回収した。 10 さらに電気透析(15 mM ammonium bicarbonate, 200V, 5 時間) により SDS を除去後、凍結乾燥した。電気溶出、電気透析には、BIOTRAP (Schleicher & Schuell 社製) を用いた。

上記の方法で高度に精製した 82 kDa タンパク質を、50 μg ずつ 7 日間隔でウサギに免疫した。免疫前および免疫 3 回後の血清を用いて、免疫滴定実験を行った。PLD 溶液 8.6×10^{-3} unit に 0-50 μl の免疫前または免疫 3 回後の血清、50 μl の 250 mM Tris-HCl(pH 7.0)、5 μl の 50 mM CaCl₂、50 μl の 0.2% Triton X-100 (商品名) および水を加えて全量を 250 μl とし、室温で 2.5 時間放置した。200 μl の Protein A Sepharose (Pharmacia) を加え、室温で 2 時間ゆるやかに振とうした後、遠心(500 × g, 5 min) し、上清の酵素活性を測定した。血清無添加の場合の酵素活性を 100% とすると、免疫前の血清 20 μl、50 μl で酵素活性がそれぞれ 95%、88% であったのに対し、免疫 3 回後の血清 20 μl、50 μl ではそれぞれ 75%、30% であった。この結果は、82 kDa タンパク質が PLD であることを証明するものである。

3. 内部アミノ酸配列の決定

25 PLD タンパク質の断片化は、ゲル中で断片化する方法 (Cleveland et al, J. Biol. Chem., 252, 1102 (1977)) で行った。2 と同様の方法で切り出した PLD タンパク質を含むゲルを、ペプチド分離用に調製した 15%アクリルアミドゲル上のスタッキングゲルウェルに挿入し、PLD タンパク質の 1/10 量の *Staphylococcus aureus* V8 proteas (和光純薬社製) を重層後、泳動を開始した。プロモ

フェノールブルーが、スタッキングゲルの中央に到達した時点で泳動を中断し、30分後再び泳動を開始した。泳動終了後、PVDF膜に転写し、染色した。分子量20、14、13、11および10kDaの位置に明瞭なバンドが認められた。分子量20、14および13kDaのペプチド断片のバンドを切り出し、プロテインシーケンサーにてアミノ酸配列を決定した。以下、それらの配列を記す。

20 kDa Asn Tyr Phe His Gly Ser Asp Val Asn ? Val Leu ? Pro Arg Asn
Pro Asp Asp(Asp) ? ? Ile
14 kDa Thr ? Asn Val Gln Leu Phe Arg Ser Ile Asp Gly Gly Ala Ala Phe
Gly Phe Pro Asp Thr Pro Glu Glu Ala Ala Lys ? Gly Leu Val Ser
10 Gly
13 kDa Ile Ala Met Gly Gly Tyr Gln Phe Tyr His Leu Ala Thr Arg Gln Pro
Ala Arg Gly Gln Ile His Gly Phe Arg Met Ala Leu ? Tyr Glu His
Leu Gly Met Leu ? Asp Val Phe

(式中、?は、アミノ酸を特定することのできなかった残基を、また()は、他のアミノ酸である可能性も高い残基を示している。)

4. イネ未熟種子cDNAライブラリーの作製

全RNAは、開花5日後の未熟種子から、SDS-フェノール法にしたがって抽出し、塩化リチウム沈殿により調製した。Poly(A)⁺RNAの調製は、Oligotex-dT30(宝酒造社製)を使用して、製造者の手引書にしたがって行った。cDNAクローニングには、cDNA合成システムプラス(アマシャム社製)、cDNAクローニングシステムλgt10(アマシャム社製)を使用した。ただし、クローニングベクターとして、λZAPIIベクター(ストラタジーン社製)、宿主細胞としてXL1-Blueを使用した。

5. プローブの作製

PLDのアミノ酸配列に該当するオリゴヌクレオチドをDNA合成装置(アブライドバイオシステムズ社製)を用いて合成した。その配列とそれらが該当するアミノ酸配列を下記する。

20KF 5' AAYTAYTTYCAYGG 3'

20KR1 5' RTCRTCRTCNGGRTT 3'

(式中、Rはプリン類AまたはGを示し、Yはビリミジン類TまたはCを示し、NはG、A、TまたはCの何れかを示す。)

20KFは、分子量 20 kDa のペプチド中に見いだされるアミノ酸配列

Asn Tyr Phe His Gly

5 をコードしている DNA 塩基配列を包含する 32 種のオリゴヌクレオチドの混合物であり、20KR1 は同ペプチド中に見いだされるアミノ酸配列

Asn Pro Asp Asp(Asp)

をコードしている DNA 塩基配列の相補鎖を包含する 128 種のオリゴヌクレオチドの混合物である。

10 cDNA 合成反応は 10 ng の Poly(A)⁺RNA、0.3 μg のランダムヘキサマー (d N6)、10 U の RNase 阻害剤 (RNAGuard、ファルマシア社製)、1 mM の dATP、dCTP、dGTP および dTTP、1 x PCR 緩衝液 (宝酒造社製)、50 mM の塩化マグネシウムおよび 100 U の逆転写酵素 (M-MuLV RTase、BRL 社製) を使用して全容積 10 μl で行った。反応は 37 °C で 30 分間行った後、95°C で 5 分間熱処理し氷上で保持した。

15 複製連鎖反応 (PCR) を、鑄型として上記 cDNA、プライマーとして 20KF と 20KR1 を使用して実施した。反応は、10 μl の cDNA 合成反応液、50 pmol の各々のプライマーの混合物、200 μM の dATP、dCTP、dGTP および dTTP、1 x PCR 緩衝液 (宝酒造社製) および 2.5 U AmpliTaq DNA ポリメラーゼ (宝酒造社製) を使用して全容積 50 μl で行った。反応は下記の温度条件に従って 30 周期を繰り返した；DNA サーモサイクラー (バーキン エルマー シータス社製) 中で：1 分間にわたり 94 °C、1 分間にわたり 40 °C、および 2 分 30 秒間にわたり 72 °C。

20 PCR 生成物を、2% のアガロースゲル上で分離した。若干数の断片が、エチジウムプロマイド染色法により検出された。その 1 つは 94 bp の長さであり、予想通りの大きさであった。

PCR 断片をゲルから切り出し、pUC19 プラスミド中にサブクローニングした。サブクローニングした PCR 断片の DNA 配列を、T7 sequencing キット (ファルマシア社製) を使用するジデオキシ法により決定した。2 つのプライマー間

には、予想されたアミノ酸配列をコードする DNA 塩基配列が認められた。以下に、プライマー間の DNA 塩基配列とそれがコードするアミノ酸を記す。

C TCT GAC GTG AAC TGT GTT CTA TGC CCT CGC
Ser Asp Val Asn Cys Val Leu Cys Pro Arg

5 上記オリゴヌクレオチドに、DNA 5'末端標識キット MEGALABEL (宝酒造社製) を使用してアイソトープ³²P (アマシャム社製) を取り込ませ、放射性オリゴヌクレオチドプローブとした。

6. PLD 遺伝子含有クローンのスクリーニング

10 上記放射性オリゴヌクレオチドをプローブとして、cDNA ライブラリーをスクリーニングした。ハイブリダイゼイション溶液は、0.5 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) 、7% SDS、1mM EDTA、100 μg/ml サケ精子 DNA とし、ハイブリダイゼイションはこれにプローブを加え 45 °Cで 16 時間行った。洗浄液は、0.3 M NaCl、30 mM クエン酸ナトリウムとし、45°C、20 分の洗浄を 2 回行った。陽性プレートを単離し、入 ZAPII クローニングベクターの製造者により記述されている方法で、*in vivo* で pBluescript プラスミド (ストラタジーン社製) にサブクローニングした。ジデオキシ法により塩基配列を決定したところ、3 で決定した内部アミノ酸配列をコードする領域が存在した。

7. 5' 末端領域の塩基配列決定

6 に記載した方法では完全長の cDNA を含むクローンを単離できなかつたため、20 RACE 法 (Edwards et al, Nucleic Acids Res., 19, 5227-5232(1991)) により 5' 末端領域を含む DNA 断片を調製した。5'-AmpliFINDER RACE Kit (クロントック社製) を、添付マニュアルに従って使用した。6 で決定した cDNA の塩基配列をもとにオリゴ DNA を合成し、4 に記載した方法で調製した mRNA を鑄型として PCR を行った。PCR 産物を PCRII ベクター (インビトロジェン社製) に 25 サブクローニングし、ジデオキシ法にて塩基配列を決定した。このようにして決定されたイネ PLD の cDNA の塩基配列及びそれがコードする推定アミノ酸配列を配列表の配列番号 2 に示す。翻訳は配列表 2 に示した 182 番目の塩基から開始されると推定された。それは、36 塩基上流に終始コドンが存在していることによる。

8. PLDcDNA クローンに対する PLD ゲノムクローンの単離およびプロモーター領域の同定

pBluescript プラスミド中にクローニングした、6で決定した PLDcDNA に対応する PLD 遺伝子の調節配列を担うゲノム DNA クローンを単離するため、イネ
5 コシヒカリのゲノムライブラリーを構築した。これは、コシヒカリ実生葉 DNA を MboI で部分消化し、シュクロース勾配遠心分離によって 16~20kb 大のフラクションを精製し、ラムダ DASH II (ストラタジーン社製)、GigapackII Gold (ストラタジーン社製) を使用することにより行った。PLDcDNA クローンをフローブとして、ゲノムライブラリーをスクリーニングした。スクリーニングは 6 に従った。ただし、ハイブリダイゼイションは 65°C で 16 時間、洗浄液は、0.5xSSC、0.1% SDS とし、65°C、20 分の洗浄を 2 回行った。ハイブリダイズしたゲノムクローンの塩基配列をジデオキシ法により決定したところ、6 で決定した cDNA 配列と相同な領域が存在した。

転写開始部位は、7 に記載した方法で決定した。転写開始部位近傍には "TA
15 TA" コンセンサス配列ボックスが認められた。ATG 翻訳開始部位は、DNA 配列決定により判ったところでは、クローンの翻訳読み枠内の最も上流の ATG コドンとして、またイネにおいて合成される mRNA 上の最初にアクセス可能な ATG コドンとして決定した。

cDNA クローンにハイブリダイズしたゲノムクローンの一部の DNA 配列を配列番号 3 に示す。ゲノム DNA 配列において、ATG 翻訳開始コドンで始まり、その対応 cDNA 配列と重なり合う読み枠が同定されている。プロモーター領域は、ATG 翻訳開始コドンの上流にあって、その直前から開始している。

9. イントロンの特定と遺伝子発現に及ぼす作用の解析

cDNA (配列番号 2) とゲノム DNA (配列番号 3) の比較から、PLD の遺伝子に 3箇所イントロンが存在することが明かとなった。そのうち、mRNA の 5' 末端非翻訳領域に対応する位置に存在する 173 bp (すなわち、配列番号 3 で示される塩基配列の第 1666 塩基から第 1838 塩基、この配列を配列番号 4 に示す) のイントロンについて、植物細胞における遺伝子発現におよぼす影響を調べた。エキソン部分を 5 ベースずつ含む 15mer のプライマー (5'-A

CCCGGTAAGCCCCAG-3', 3'-CCCCCGCGTCCATCC-5') を合成し、ゲノムクローンを鑄型として「5. プローブの作製」の項に記した方法でPCRを行った。PCR産物をPCR II ベクターにサブクローニングし、そこからEcoRIで切り出した断片を平滑末端処理した後プラスミド pBI221 (東洋紡社製) のSmaI サイトに組み込んだ(図1参照)。以下、既報 (Shimamoto et al. Nature, 338, 274-276 (1989)) の方法にしたがってイネ培養細胞 (Baba et al. Plant Cell Physiol. 27, 463-471 (1986)) に上記組換えプラスミドを導入後、 β -glucuronidase (GUS) 活性を測定した。表2に示したように、イントロンの導入により GUS 活性の増大が認められた。また、表3に示したとおり、イントロンが逆方向に組み込まれた場合にもGUS活性の増大が認められた。なお、イントロンの方向は、イントロン配列中に存在するBgIII サイトと pBI221 に存在するBamHI I サイトを利用して、両酵素で切り出される断片の長さにより特定した。

表2 プロトプラストにおけるGUS活性

プラスミド	GUS活性
pBI221	10.4
pBI221-イントロン	105.7

(pmol MU/min./mg protein)

15

表3 プロトプラストにおけるGUS活性

プラスミド	GUS活性
pBI221	8.8
pBI221+イントロン	79.4
pBI221+イントロン(逆方向)	54.2

(pmol MU/min./mg protein)

配列表

配列番号：1

配列の長さ：183

配列の型：核酸

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：Oryza sativa

配列

ACCCGGTAAG CCCAGTGTGC TTAGGCTAAG CGCACTAGAG CTTCTTGCTC GCTTGCTTCT	60
TCTCCGCTCA GATCTGCTTG CTTGCTTGCT TCGCTAGAAC CCTACTCTGT GCTGCGAGTG	120
TCGCTGCTTC GTCTTCCTTC CTCAAGTTCG ATCTGATTGT GTGTGTGGGG GGGCGCAGGT	180
AGG	183

配列番号：2

配列の長さ：3040

配列の型：核酸

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：Oryza sativa

配列

AGTCTCTCTT CTCCCGCAAT TTTATAATCT CGATCGATCC AATCTGCTCC CCTTCTTCTT	60		
CTACTCTCCC CATCTCGGCT CTCGCCATCG CCATCCTCCT CTCCCTTCCC GGAGAAAGACG	120		
CCTCCCTCCG CCGATCACCA CCCGGTAGGG CGAGGAGGG GA GCCAAATCCA AATCAGCAGC	180		
C ATG GCG CAG ATG CTG CTC CAT GGG ACG CTG CAC GCC ACC ATC TTC GAG	229		
Met Ala Gln Met Leu Leu His Gly Thr Leu His Ala Thr Ile Phe Glu			
1	5	10	15
GCG GCG TCG CTC TCC AAC CCG CAC CGC GCC AGC GGA AGC GCC CCC AAG	277		
Ala Ala Ser Leu Ser Asn Pro His Arg Ala Ser Gly Ser Ala Pro Lys			
20	25	30	

TTC ATC CGC AAG TTT GTG GAG GGG ATT GAG GAC ACT GTG GGT GTC GGC 325
 Phe Ile Arg Lys Phe Val Glu Gly Ile Glu Asp Thr Val Gly Val Gly
 35 40 45
 AAA GGC GCC ACC AAG GTG TAT TCT ACC ATT GAT CTG GAG AAA GCT CGT 373
 Lys Gly Ala Thr Lys Val Tyr Ser Thr Ile Asp Leu Glu Lys Ala Arg
 50 55 60
 GTA GGG CGA ACT AGG ATG ATA ACC AAT GAG CCC ATC AAC CCT CGC TGG 421
 Val Gly Arg Thr Arg Met Ile Thr Asn Glu Pro Ile Asn Pro Arg Trp
 65 70 75 80
 TAT GAG TCG TTC CAC ATC TAT TGC GCT CAT ATG GCT TCC AAT GTG ATC 469
 Tyr Glu Ser Phe His Ile Tyr Cys Ala His Met Ala Ser Asn Val Ile
 85 90 95
 TTC ACT GTC AAG ATT GAT AAC CCT ATT GGG GCA ACG AAT ATT GGG AGG 517
 Phe Thr Val Lys Ile Asp Asn Pro Ile Gly Ala Thr Asn Ile Gly Arg
 100 105 110
 GCT TAC CTG CCT GTC CAA GAG CTT CTC AAT GGA GAG GAG ATT GAC AGA 565
 Ala Tyr Leu Pro Val Gln Glu Leu Leu Asn Gly Glu Glu Ile Asp Arg
 115 120 125
 TGG CTC GAT ATC TGT GAT AAT AAC CGC GAG TCT GTT GGT GAG AGC AAG 613
 Trp Leu Asp Ile Cys Asp Asn Asn Arg Glu Ser Val Gly Glu Ser Lys
 130 135 140
 ATC CAT GTG AAG CTT CAG TAC TTC GAT GTT TCC AAG GAT CGC AAT TGG 661
 Ile His Val Lys Leu Gln Tyr Phe Asp Val Ser Lys Asp Arg Asn Trp
 145 150 155 160
 GCG AGG GGT GTC CGC AGT ACC AAG TAT CCA GGT GTT CCT TAC ACC TTC 709
 Ala Arg Gly Val Arg Ser Thr Lys Tyr Pro Gly Val Pro Tyr Thr Phe
 165 170 175
 TTC TCT CAG AGG CAA GGG TGC AAA GTT ACC TTG TAC CAA GAT GCT CAT 757
 Phe Ser Gln Arg Gln Gly Cys Lys Val Thr Leu Tyr Gln Asp Ala His

180	185	190	
GTC CCA GAC AAC TTC ATT CCA AAG ATT CCG CTT GCC GAT GGC AAG AAT 805			
Val Pro Asp Asn Phe Ile Pro Lys Ile Pro Leu Ala Asp Gly Lys Asn			
195	200	205	
TAT GAA CCC CAC AGA TGC TGG GAG GAT ATC TTT GAT GCT ATA AGC AAT 853			
Tyr Glu Pro His Arg Cys Trp Glu Asp Ile Phe Asp Ala Ile Ser Asn			
210	215	220	
GCT CAA CAT TTG ATT TAC ATC ACT GGC TGG TCT GTA TAC ACT GAG ATC 901			
Ala Gln His Leu Ile Tyr Ile Thr Gly Trp Ser Val Tyr Thr Glu Ile			
225	230	235	240
ACC TTG GTT AGG GAC TCC AAT CGT CCA AAA CCT GGA GGG GAT GTC ACC 949			
Thr Leu Val Arg Asp Ser Asn Arg Pro Lys Pro Gly Gly Asp Val Thr			
245	250	255	
CTT GGG GAG TTG CTC AAG AAG GAC ACT GAA GGT GTT CGG GTC CTC 997			
Leu Gly Glu Leu Leu Lys Lys Ala Ser Glu Gly Val Arg Val Leu			
260	265	270	
ATG CTT GTG TGG GAT GAC AGG ACT TCA GTT GGT TTG CTA AAG AGG GAT 1045			
Met Leu Val Trp Asp Asp Arg Thr Ser Val Gly Leu Leu Lys Arg Asp			
275	280	285	
GGC TTG ATG GCA ACA CAT GAT GAG GAA ACT GAA AAT TAC TTC CAT GGC 1093			
Gly Leu Met Ala Thr His Asp Glu Glu Thr Glu Asn Tyr Phe His Gly			
290	295	300	
TCT GAC GTG AAC TGT GTT CTA TGC CCT CGC AAC CCT GAT GAC TCA GGC 1141			
Ser Asp Val Asn Cys Val Leu Cys Pro Arg Asn Pro Asp Asp Ser Gly			
305	310	315	320
AGC ATT GTT CAG GAT CTG TCG ATC TCA ACT ATG TTT ACA CAC CAT CAG 1189			
Ser Ile Val Gln Asp Leu Ser Ile Ser Thr Met Phe Thr His His Gln			
325	330	335	
AAG ATA GTA GTT GTT GAC CAT GAG TTG CCA AAC CAG GGC TCC CAA CAA 1237			

Lys Ile Val Val Val Asp His Glu Leu Pro Asn Gln Gly Ser Gln Gln
 340 345 350

AGG AGG ATA GTC ACT TTC GTT GGT GGC CTT GAT CTC TGT GAT GGA AGG 1285
 Arg Arg Ile Val Ser Phe Val Gly Gly Leu Asp Leu Cys Asp Gly Arg
 355 360 365

TAT GAC ACT CAG TAC CAT TCT TTG TTT AGG ACA CTC GAC AGT ACC CAT 1333
 Tyr Asp Thr Gln Tyr His Ser Leu Phe Arg Thr Leu Asp Ser Thr His
 370 375 380

CAT GAT GAC TTC CAC CAG CCA AAC TTT GCC ACT GCA TCA ATC AAA AAG 1381
 His Asp Asp Phe His Gln Pro Asn Phe Ala Thr Ala Ser Ile Lys Lys
 385 390 395 400

GCT GGA CCT AGA GAG CCA TGG CAT GAT ATT CAC TCA CGG CTG GAA GGG 1429
 Gly Gly Pro Arg Glu Pro Trp His Asp Ile His Ser Arg Leu Glu Gly
 405 410 415

CCA ATC GCA TGG GAT GTT CTT TAC AAT TTC GAG CAG AGA TGG AGA AAG 1477
 Pro Ile Ala Trp Asp Val Leu Tyr Asn Phe Glu Gln Arg Trp Arg Lys
 420 425 430

CAG GGT GGT AAG GAT CTC CTT CTG CAG CTC AGG GAT CTG TCT GAC ACT 1525
 Gln Gly Lys Asp Leu Leu Leu Gln Leu Arg Asp Leu Ser Asp Thr
 435 440 445

ATT ATT CCA CCT TCT CCT GTT ATG TTT CCA GAG GAC AGA GAA ACA TGG 1573
 Ile Ile Pro Pro Ser Pro Val Met Phe Pro Glu Asp Arg Glu Thr Trp
 450 455 460

AAT GTT CAG CTA TTT AGA TCC ATT GAT GGT GGT GCT GCT TTT GGG TTC 1621
 Asn Val Gln Leu Phe Arg Ser Ile Asp Gly Gly Ala Ala Phe Gly Phe
 465 470 475 480

CCT GAT ACC CCT GAG GAG GCT GCA AAA GCT GGG CTT GTA AGC GGA AAG 1669
 Pro Asp Thr Pro Glu Glu Ala Ala Lys Ala Gly Leu Val Ser Gly Lys
 485 490 495

GAT CAA ATC ATT GAC AGG AGC ATC CAG GAT GCA TAC ATA CAT GCC ATC 1717
 Asp Gln Ile Ile Asp Arg Ser Ile Gln Asp Ala Tyr Ile His Ala Ile
 500 505 510
 CGG AGG GCA AAG AAC TTC ATC TAT ATA GAG AAC CAA TAC TTC CTT GGA 1765
 Arg Arg Ala Lys Asn Phe Ile Tyr Ile Glu Asn Gln Tyr Phe Leu Gly
 515 520 525
 AGT TCC TAT GCC TGG AAA CCC GAG GGC ATC AAG CCT GAA GAC ATT GGT 1813
 Ser Ser Tyr Ala Trp Lys Pro Glu Gly Ile Lys Pro Glu Asp Ile Gly
 530 535 540
 GCC CTG CAT TTG ATT CCT AAG GAG CTT GCA CTG AAA GTT GTC AGT AAG 1861
 Ala Leu His Leu Ile Pro Lys Glu Leu Ala Leu Lys Val Val Ser Lys
 545 550 555 560
 ATT GAA GCC GGG GAA CGG TTC ACT GTT TAT GTT GTG GTG CCA ATG TGG 1909
 Ile Glu Ala Gly Glu Arg Phe Thr Val Tyr Val Val Val Pro Met Trp
 565 570 575
 CCT GAG CGT GTT CCA GAG AGT GGA TCT GTT CAG GCA ATC CTG GAC TGG 1957
 Pro Glu Gly Val Pro Glu Ser Gly Ser Val Val Gln Ala Ile Leu Asp Trp
 580 585 590
 CAA AGG AGA ACA ATG GAG ATG ATG TAC ACT GAC ATT ACA GAG GCT CTC 2005
 Gln Arg Arg Thr Met Glu Met Met Tyr Thr Asp Ile Thr Glu Ala Leu
 595 600 605
 CAA GCC AAG GGA ATT GAA GCG AAC CCC AAG GAC TAC CTC ACT TTC TTC 2053
 Gln Ala Lys Gly Ile Glu Ala Asn Pro Lys Asp Tyr Leu Thr Phe Phe
 610 615 620
 TGC TTG GGT AAC CGT GAG GTG AAG CAG GCT GGG GAA TAT CAG CCT GAA 2101
 Cys Leu Gly Asn Arg Glu Val Lys Gln Ala Gly Glu Tyr Gln Pro Glu
 625 630 635 640
 GAA CAA CCA GAA GCT GAC ACT GAT TAC AGC CGA GCT CAG GAA GCT AGG 2149
 Glu Gln Pro Glu Ala Asp Thr Asp Tyr Ser Arg Ala Gln Glu Ala Arg

645 650 655
AGG TTC ATG ATC TAT GTC CAC ACC AAA ATG ATG ATA GTT GAC GAT GAG 2197
Arg Phe Met Ile Tyr Val His Thr Lys Met Met Ile Val Asp Asp Glu
660 665 670
TAC ATC ATC ATC GGT TCT GCA AAC ATC AAC CAG AGG TCG ATG GAC GGC 2245
Tyr Ile Ile Ile Gly Ser Ala Asn Ile Asn Gln Arg Ser Met Asp Gly
675 680 685
GCT AGG GAC TCT GAG ATC GCC ATG GGC GGG TAC CAG CCA TAC CAT CTG 2293
Ala Arg Asp Ser Glu Ile Ala Met Gly Gly Tyr Gln Pro Tyr His Leu
690 695 700
GCG ACC AGG CAA CCA GCC CGT GGC CAG ATC CAT GGC TTC CGG ATG GCG 2341
Ala Thr Arg Gln Pro Ala Arg Gly Gln Ile His Gly Phe Arg Met Ala
705 710 715 720
CTG TGG TAC GAG CAC CTG GGA ATG CTG GAT GAT GTG TTC CAG CGC CCC 2389
Leu Trp Tyr Glu His Leu Gly Met Leu Asp Asp Val Phe Gln Arg Pro
725 730 735
GAG AGC CTG GAG TGT GTG CAG AAG GTG AAC AGG ATC GCG GAG AAG TAC 2437
Glu Ser Leu Glu Cys Val Gln Lys Val Asn Arg Ile Ala Glu Lys Tyr
740 745 750
TGG GAC ATG TAC TCC AGC GAC GAC CTC CAG CAG GAC CTC CCT GGC CAC 2485
Trp Asp Met Tyr Ser Ser Asp Asp Leu Gln Gln Asp Leu Pro Gly His
755 760 765
CTC CTC AGC TAC CCC ATT GGC GTC GCC AGC GAT GGT GTG GTG ACT GAG 2533
Leu Leu Ser Tyr Pro Ile Gly Val Ala Ser Asp Gly Val Val Thr Glu
770 775 780
CTG CCC GGG ATG GAG TAC TTT CCT GAC ACA CGG GCC CGC GTC CTC GGC 2581
Leu Pro Gly Met Glu Tyr Phe Pro Asp Thr Arg Ala Arg Val Leu Gly
785 790 795 800
GCC AAG TCG GAT TAC ATG CCC CCC ATC CTC ACC TCA TAGACGAGGA AGCACT 2633

Ala Lys Ser Asp Tyr Met Pro Pro Ile Leu Thr Ser

805

810

ACACTACAAT CTGCTGGCTT CTCCTGTCAAG TCCTTCTGTA CTTCTTCAGT TTGGTGGCGA 2693
 GATGGTATGG CCGTTGTTCA GAATTCTTC AGAATAGCAG TTGTTACAGT TGTGAATCAT 2753
 AAACTAATAA GTGCAGTATC TGTGCATGGT TGAGTTGGGA AGAACATCGG GGATGCAATG 2813
 ATGCTTGTGA AGTTGTGATG CCGTTGTAA GATGGGAAGT TGGGAACCTAC TAAGTAATTG 2873
 GCATGATTGT ACTTTGCACT ACTGTTAGC GTTGTGATA CTGGTTAACCT GTGTGTTCAT 2933
 CTGAACTTGA TTCTTGATCC AGTTTGCGC ATTACCAAGTT TATCATCGTT CTTCAGGAAA 2993
 AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA 3040

配列番号：3

配列の長さ：2799

配列の型：核酸

配列の種類：genomic DNA

起源

生物名：Oryza sativa

配列

CAAGGGTGTATAGATTG TCTCGTAAAA TAGTATTATA ATATTATAAA CTTATTACTC 60
 TATCCGTTCT AAAATATAAG AACCTTATGA CTGGATGGAA CATTTCCTAG TACTACGAAT 120
 CTGAACACAT GTCTAGATTCA ATAGTACTAG GAAATGTCTC ATCGCGGTAC TAGGTTCTTA 180
 TATTTTAGGA TGGAGGGAGT TTAATATAAA ACTAATGGTT AGAACCTTGA AAGTTGATT 240
 TTAAATGTCA AATATTTATG GCTGGAGGTA GTATAATATG TTTTTTTGG GACGTAGACT 300
 AGGTAGTATA ATATGTTGG TTGTGTTAG ATCCAATATT TGGATCCAAA CTTCAGTCAT 360
 TTTCCATCAC ATCAACTTGT CATATACACA TAACCTTCA GTCACATCAT CCCCAATTTC 420
 AACCAAATC AAACCTTGCG CTGAACCTAA CACACCTTT GGGCCCGTT AGTTCCCCAA 480
 TTTTTTCCC AAAAACATCA CATCGAATCT TTGGACACAT GCATGAAGCA TTAAATATAG 540
 ATAAAAAGAA AAACAAATTG CACAGTTATG GAGGAAATCG CGAGACGAAT CTTTAAGCC 600
 TAATTAGTCC GTGATTAGCC ATAAGTGCTA CAGTAACCCA ATTGTGCTAA TGACGGCTTA 660
 ATTAGTCTCC ACAAGATTG TCTCGCAGTT TCCAGGGAG TTCTGAAATT AGTTTTTCA 720

TTCGTGTCGG AAAACCCCTT CCGACATCCG GTCAAACGTT CGATATGACA CCCACAAATT 780
 TTCTTTCCC CAACTAAACA CACCCTTAT CTCTTACCCCT CTGGCTCTT CAGTAGGCAT 840
 ATCCAAGACA GCTGGTAATG CAGGCTCGGA CATAATTGA CAGTTACGTT CATGTGACCG 900
 ACGGTTGATG CTAGTGCAAC TGCAACATAC TGTTCAGATG GATGTCCCAA CGAGCTCAAA 960
 ACAACTTAGG TGGCGCGTCG CGATTCATCA ATAACCTAAA TGGAAAGCGCA AGTGCACGTA 1020
 CGAAAATGAC AGCGAGTGAG GTGGCGAGCC TCACCTTGGT GATCCCAACC GGATAAGCTA 1080
 TGCATCAGCC AGTTTCGTGG GGCTGCACAT TTCTCGAAC ACCTGGAGTC CACGCCGCCG 1140
 GCGACGTCGG CACAGCGCGC CCGCCCCACCG CCCACGCGACG CGCTTGACTC CACCCATGTT 1200
 CTCCCTTCTC GACGCCCGCG AAGCCAGCGA ACCGATCCGA GGAAGTCAAG CCCCCACCGC 1260
 CACTTGGACC GACCTCGGG A CGACGACGCC CCCCGCGCTCT TCTAGACGCG CGGACGACGC 1320
 GGGCGCTGGC TCCCGCACGC GACGTGCGG TCATGGAGTA ACCGCGACGG ACAGATACTT 1380
 CTACCCGTTT TTAACCTCGC CTCCTCCTCC TCCCCGGCTCG AGATCCGTGG CCACGACCG 1440
 TGGTGGGAAA CCGGGAACGA CGTGCACGCA CGCACACAGG GCAAGTTCA GTAGAAAAAT 1500
 CGCCGGCATC CAGATCGGG A CAGTCTCTCT TCTCCCGCAA TTTTATAATC TCGCTCGATC 1560
 CAATCTGCTC CCCTCTTCTC TCTACTCTCC CCATCTCGGC TCTCGCCATC GCCATCCTCC 1620
 TCTCCCTTCC CCGAGAAGAC GCCTCCCTCC GCCGATCACC ACCCGGTAAG CCCAGTGTGC 1680
 TTAGGCTAAG CGCACTAGAG CTTCTTGCTC GCTTGCTTCT TCTCCGCTCA GATCTGCTTG 1740
 CTTGCTTGCT TCGCTAGAAC CCTACTCTGT GCTGGAGTG TCGCTGCTTC GTCTTCCCTC 1800
 CTCAAGTTCG ATCTGATTGT GTGTGTGGGG GGGCCGAGGT AGGGCGAGGA GGGAGCCAAA 1860
 TCCAAATCAG CAGCC ATG GCG CAG ATG CTG CTC CAT GGG ACG CTG CAC GCC 1911

Met Ala Gln Met Leu Leu His Gly Thr Leu His Ala

1	5	10
---	---	----

ACC ATC TTC GAG GCG GCG TCG CTC TCC AAC CCG CAC CGC GCC AGC GGA 1959
 Thr Ile Phe Glu Ala Ala Ser Leu Ser Asn Pro His Arg Ala Ser Gly

15	20	25
----	----	----

AGC GCC CCC AAG TTC ATC CGC AAG GTTCGGACCC TTCTCCTTAA TCTACTCGTC 2013

Ser Ala Pro Lys Phe Ile Arg Lys

30	35	
----	----	--

TTTGCTCTTG CTCTTTTCT TTTGTGTCCC TTTCTTGTGT GTGCGTTTGC ATGAGCCCGA 2073

ATTTGATCTG CTAGTGCACA GTACAGTCAG ATACACTGAA ACGATCTGGA AATTCTGGAT 2133
 TATTAGAAA AATAAAGAGG TAGTAGACAA GAATTGGAGA TACTTCTAT CAAGATTGGT 2193
 CTATTATGCT TGGCCATTTC TTGTTTGACC CAAGTACTTC TTTGAATCTA GAGTTTGCTG 2253
 TGTGTGATGT GGTGTGTGTT TGTGTCACCA AAAATCTTCA TTAGCTAAAA CTGAAATTTT 2313
 ATTTATTAAC TGACCTACTA AAAATGTAGA GTTCTCTGTG TGTGATGTGT GCTTGTGTCA 2373
 CCAAAAATCT TGATTTGATA GAGTTTTAT TTATTTATTA ACTGACCTAC TACAAATCTA 2433
 TTGCTGTATG CTATGTGTGT CTGTATCACC TGAAATGCAA TGTCTTCTTC TTTGTTGTTC 2493
 TTGATCTAAC ACGTGAGCTC ATGTCAACAG TTT GTG GAG GGG ATT GAG GAC ACT 2547

Phe Val Glu Gly Ile Glu Asp Thr

40

GTG GGT GTC GGC AAA GGC GCC ACC AAG GTG TAT TCT ACC ATT GAT CTG 2595
 Val Gly Val Gly Lys Gly Ala Thr Lys Val Tyr Ser Thr Ile Asp Leu
 45 50 55 60
 GAG AAA GCT CGT GTA GGG CGA ACT AGG ATG ATA ACC AAT GAG CCC ATC 2643
 Glu Lys Ala Arg Val Gly Arg Thr Arg Met Ile Thr Asn Glu Pro Ile
 65 70 75
 AAC CCT CGC TGG TAT GAG TCG TTC CAC ATC TAT TGC GCT CAT ATG GCT 2691
 Asn Pro Arg Trp Tyr Glu Ser Phe His Ile Tyr Cys Ala His Met Ala
 80 85 90
 TCC AAT GTG ATC TTC ACT GTC AAG ATT GAT AAC CCT ATT GGG GCA ACG 2739
 Ser Asn Val Ile Phe Thr Val Lys Ile Asp Asn Pro Ile Gly Ala Thr
 95 100 105
 AAT ATT GGG AGG GCT TAC CTG CCT GTC CAA GAG CTT CTC AAT GGA GAG 2787
 Asn Ile Gly Arg Ala Tyr Leu Pro Val Gln Glu Leu Leu Asn Gly Glu
 110 115 120
 GAG ATT GAC AGA 2799
 Glu Ile Asp Arg
 125

配列番号 : 4

配列の長さ : 173

配列の型 : 核酸

配列の種類 : Genomic DNA

起源

生物名 : Oryza sativa

配列

GTAAGCCCAG TGTGCTTAGG CTAAGCGCAC TAGAGCTTCT TGCTCGCTTG CTTCTTCTCC 60
GCTCAGATCT GCTTGCTTGC TTGCTTCGCT AGAACCCCTAC TCTGTGCTGC GAGTGTGCT 120
GCTTCGTCTT CCTTCCTCAA GTTCGATCTG ATTGTGTGTG TGGGGGGGGCG CAG 173

請求の範囲

1. 配列表の配列番号 1 で示される塩基配列を有する単離された D N A 断片及び該塩基配列において 1 又は複数のヌクレオチドが付加、挿入、欠失若しくは置換されておりかつその下流に存在する遺伝子の発現を促進する作用を有する単離された D N A 断片。
5
2. 配列表の配列番号 1 で示される塩基配列を有する請求項 1 記載の D N A 断片。
3. 配列表の配列番号 4 で示される塩基配列を有する単離された D N A 断片及び該塩基配列において 1 又は複数のヌクレオチドが付加、挿入、欠失若しくは置換されておりかつその下流に存在する遺伝子の発現を促進する作用を有する請求項
10 1 記載の D N A 断片。
4. 配列表の配列番号 4 で示される塩基配列を有する請求項 3 記載の D N A 断片。
5. 請求項 1 記載の D N A 断片と、その下流に機能的に連結された発現すべき外
来遺伝子とを含む組換えベクター。
6. 前記 D N A 断片は配列表の配列番号 1 で示される塩基配列を有する請求項 5
15 記載の組換えベクター。
7. 前記 D N A 断片は配列表の配列番号 4 で示される塩基配列を有する請求項 5 記載の組換えベクター。
8. 請求項 3 記載の組換えベクターを宿主細胞に導入し、前記外来遺伝子を発現
させることから成る、外来遺伝子の発現方法。
20
9. 前記 D N A 断片は配列表の配列番号 1 で示される塩基配列を有する請求項 8 記載の方法。
10. 前記 D N A 断片は配列表の配列番号 4 で示される塩基配列を有する請求項 9 記載の方法。

図面

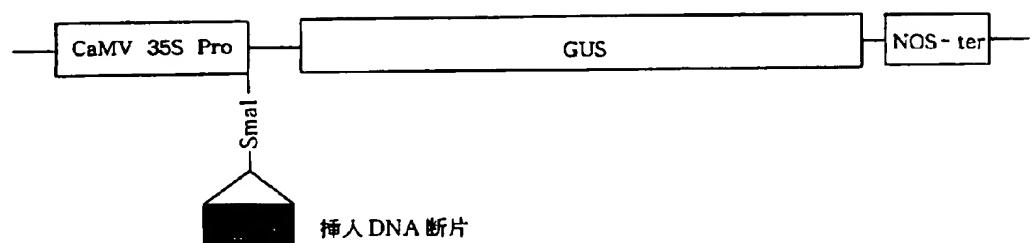


図 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/00812

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N15/11, C12N15/63, C12N15/82, C12N9/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N15/00, C12N9/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE, WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 03-103182, A (Mitsubishi Kasei Corp.), April 30, 1991 (30. 04. 91) (Family: none)	1 - 10
A	Judy C. et al. "Introns increase gene expression in cultured maize cells" GENE & DEVELOPMENT (1987) Vol. 1, p. 1183-1200	1 - 10
A	Akira T. et al. "Enhancement of foreign gene expression by a dicot intron in rice but not in tobacco is correlated with an increased level of mRNA and an efficient splicing of the intron" Nucleic Acids Research (1990) Vol. 18, No. 23, p. 6767-6770	1 - 10
PA	Jun U. et al. "Purification and Characterization of Phospholipase D (PLD) from rice (<i>Oryza sativa</i> L.) and Cloning of cDNA for PLD from Rice and Maize (<i>Zea mays</i> L.)" Plant Cell Physiol. (1995) Vol. 36, No. 5, p. 903-914	1 - 10

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

June 19, 1996 (19. 06. 96)

Date of mailing of the international search report

July 2, 1996 (02. 07. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Faxsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP96/00812

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. C1° C12N15/11, C12N15/63, C12N15/82, C12N9/16

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. C1° C12N15/00, C12N9/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE, WPI, WPI/L, BIOSIS REVIEWS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリーや 記載事項		関連する 請求の範囲の番号
A	JP.03-103182, A (三菱化成株式会社) 30.4月.1991(30.4.91) (ファミリーなし)	1-10
A	Judy C. et al. "Introns increase gene expression in cultured maize cells" GE NE & DEVELOPMENT (1987) 第1巻 p.1183-1200	1-10
A	Akira T. et al. "Enhancement of foreign gene expression by a dicot intron in rice but not in tobacco is correlated with an increased level of mRNA and an efficient splicing of the intron" Nucleic Acids Research (1990) 第18巻 第23号 p.6767-6770	1-10
PA	Jun U. et al. "Purification and Characterization of Phospholipase D (PLD) from rice (<i>Oryza sativa</i> L.) and Cloning of cDNA for PLD from Rice and Maize (<i>Zea mays</i> L.)" Plant Cell Physiol. (1995) 第36巻 第5号 p.903-914	1-10

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19. 06. 96

国際調査報告の発送日

02.07.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

高堀 栄二

4B 9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3449